469399/R9

この添付文書をよく読んでから使用してください。

体外診断用医薬品

＊＊ 2011 年 5 月改訂（第 3 版）
＊ 2009 年 10 月改訂（第 2 版）

製造販売承認番号 20600AMY00146000

血液検査用メトトレキサートキット

メトトレキサート-Ⅱ・ダイナパック®

【全般的な注意】

1. 本製品は体外診断用であり、それ以外の目的に使用しないこと。
2. 診断は、他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断すること。
3. 添付文書に記載された使用方法に従って使用すること。本添付文書に記載された使用方法および使用目的以外での使用については、測定結果の信頼性は保証しない。
4. 本測定で使用する試薬類には、ヒト由来成分が含まれているものがあり、感染の危険があるので感染性のあるものとして取り扱うこと。詳細は、**【形状・構造等（キットの構成）】**または**【用法・用量（操作方法）】**を参照のこと。
5. 本測定で使用する試薬類には、保存剤としてアジ化ナトリウムが含まれているものがある。誤って目や口に入れたり皮膚に付着した場合には、水で十分に洗い流す等の応急措置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けること。詳細は、**【形状・構造等（キットの構成）】**または**【用法・用量（操作方法）】**を参照のこと。
6. 使用する機器の添付文書および取扱説明書をよく読んでから使用すること。
7. 本添付文書中の薬剤に関する記述の中には、海外での情報が含まれている。日本における最新の薬剤の効能・効果等は、薬剤の添付文書等を参照のこと。

【形状・構造等（キットの構成）】

○ 試薬パック
Ⓦ試薬 W
（主な含有物：洗浄液　保存剤：アジ化ナトリウム）
Ⓟ試薬 P
（主な含有物：前処理液、緩衝液、界面活性剤、タンパク質安定化剤
保存剤：アジ化ナトリウム）
Ⓢ試薬 S
抗メトトレキサートマウスモノクローナル抗体
（ 他の含有物：緩衝液、タンパク質安定化剤　保存剤：アジ化ナトリウム）
Ⓣ試薬 T
蛍光標識メトトレキサート
（ 他の含有物：緩衝液、界面活性剤、タンパク質安定化剤
保存剤：アジ化ナトリウム）

【使用目的】

血漿又は血清中のメトトレキサートの測定

【測定原理】

Fluorescence Polarization Immunoassay（FPIA）法

＊【操作上の注意】

（1）測定試料の性質、採取法

・検体には、血清または血漿（抗凝固剤として、EDTA、ヘパリン、シュウ酸カリウム、フッ化ナトリウムを使用）を用いること。検体は遮光して保存すること [1]。詳細は使用する機器の取扱説明書を参照のこと。
・採血時間は投与量、投与時間および患者の臨床症状に合わせて決定すること。詳細は薬剤の添付文書等を参照のこと。

（2）妨害物質・妨害薬剤

＊ ・ビリルビン、コレステロール、ヘモグロビン、総タンパク質、トリグリセライドが本キットの測定値に与える影響は 10%以下である。結果を次に示す。

物質	検討濃度	影響
ビリルビン	20 mg/dL	10%以下
コレステロール	700 mg/dL	5%以下
ヘモグロビン	0.86 g/dL	5%以下
総タンパク質	8 g/dL	5%以下
トリグリセライド	1000 mg/dL	5%以下

・メトトレキサートの主要な代謝物である 7- ヒドロキシメトトレキサートの交差反応性を試験した。交差反応性のある物質およびメトトレキサートを含むサンプルと、メトトレキサートのみを含むサンプルの濃度を比較したところ、メトトレキサート投与量が高く、血漿レベルも高い患者の 1000 μmol/L の代謝濃度においては、メトトレキサート濃度変化は認められなかった。
メトトレキサートの通常の代謝物である DAMPA の交差反応性を試験した。メトトレキサートおよび代謝物を含むサンプルと、メトトレキサートのみを含むサンプルの濃度を比較したところ、メトトレキサート濃度 5 μmol/L と代謝濃度 5 μmol/L（Carboxypeptidase G2 療法を受けてから短時間の患者で認められる濃度）を含むサンプルでは、26％の測定値の増加が認められた。また、1000 μmol/L の代謝物を含み、メトトレキサートを含まないサンプルでは、交差反応性が 59％まで増加する可能性がある。
なお、下記の化合物の交差反応性は 1000 μmol/L まですべて、1％未満であった。

アドリアマイシン	5- フルオロウラシル
シクロホスファミド	6- メルカプトプリン
シトシン	メトプテリン
ジヒドロ葉酸	プレドニゾロン
DL-L- テトラヒドロ葉酸	ピリメタミン
DL-N-5- メチル - テトラヒドロ葉酸	スルファメトキサゾール
DL-6- メチル -5,6,7,8 - テトラヒドロプテリン	トリアムテレン トリメトプリム
葉酸	ビンブラスチン
ホリン酸（ロイコボリン）	ビンクリスチン

（3）その他

本キットは、TDX アナライザーおよび TDXFLX アナライザーの試薬である。

＊＊【用法・用量（操作方法）】

（1）試薬の調製方法

試薬はそのまま用いる。

（2）必要な器具・器材・試料等

機器上のソフトウェアが次のバージョンであること。
TDX アナライザーは、バージョン 16.0 以上
TDXFLX アナライザーは、バージョン 3.0 以上

＊＊ ・メトトレキサート - Ⅱ・キャリブレータ（Methotrexate Ⅱ Calibrators）
（製品番号：7A12-01）：各 2.5 mL 6 ビン
（主な含有物：メトトレキサート、ヒト血清　保存剤：アジ化ナトリウム）

キャリブレータ	濃度（μmol/L）
A	0.00
B	0.05
C	0.15
D	0.30
E	0.60
F	1.00

＊＊ ・メトトレキサート - Ⅱ・コントロール（Methotrexate Ⅱ Controls）
（製品番号：7A12-10）：各 2.5 mL 6 ビン
（主な含有物：メトトレキサート、ヒト血清　保存剤：アジ化ナトリウム）

コントロール	濃度（μmol/L）	管理範囲（μmol/L）
L	0.07	0.04 - 0.10
M	0.40	0.34 - 0.46
H	0.80	0.67 - 0.93
X	5.00	4.00 - 6.00
Y	50.00	37.20 - 62.80
Z	500.00	369.19 - 630.81

・TDX 希釈緩衝液（製品番号：9519）
・TDX サンプルキュベット
・TDX サンプルカートリッジ
・ピペット

（3）測定（操作）法

蛍光偏光測定装置を用いてメトトレキサート量を測定する。
1）キャリブレータ、検体、試薬 P、試薬 S、試薬 T 及び希釈用緩衝液の所定量をとり、反応させる。
2）反応後、励起光をあて、波長 510 ～ 560 nm における蛍光強度を測定し、蛍光偏光度 mp（注）を算出する。
3）検量線より検体中のメトトレキサート量を求める。
（注）mp
次式で定義される蛍光偏光度（p）の千分の一を mp（ミリポーラリゼーション）とする。

$$p = \frac{I_{/\!/} - I_{\perp}}{I_{/\!/} + I_{\perp}}$$

$I_{/\!/}$ ：偏光励起光に対して平行な蛍光強度
$I_{\perp}$：偏光励起光に対して垂直な蛍光強度

（参考）機械側から見た操作法

1. アッセイパラメータ

本キットのアッセイパラメータは、21項目が初期設定されている。アッセイパラメータの詳細については、使用する機器の取扱説明書を参照のこと。

初回のキャリブレーションおよび測定を開始する前に、コントロールパネルの ASSAY 22 PRINT キーを押す。表示されたパラメータと次のパラメータが一致することを確認する。

22.	METHOTREXATE	
22.1	SPL VOL	10.0
22.2	SPL REP	1
22.3	LOLIM	0.00
22.4	HILIM	1000.00
22.5	CAL VOL	10.0
22.6	CAL REP	2
22.7	CONC A	0.00
22.8	CONC B	0.05
22.9	CONC C	0.15
22.10	CONC D	0.30
22.11	CONC E	0.60
22.12	CONC F	1.00
22.13	UNITS	2
22.14	CRV FIT	2
22.15	MX DEV	5.0
22.16	MN POLA	*
22.17	MN SPAN	#
22.18	MODE	42
22.19	GAIN	*
22.20	MX BKG	2500.00
22.21	MN TR	*

パラメータを変更するときは次の手順で行う。

1. ASSAY 22 • に続いて、変更したいパラメータ番号を押し、EDIT キーを押す。
2. 新しいパラメータの値を入力し、STORE キーを押す。
3. NEXT キーを押すと次のパラメータが表示される。パラメータを変更するごとに、STORE キーを押して保存する。
4. パラメータの変更が終わったら、STOP キーを押す。

機器は操作が可能な状態に戻り、ディスプレイ画面には READY が表示される。

注：* がついたパラメータは、変更できない。
がついたパラメータは変更可能で、試薬原料の変更に伴って変更されることがある。

次の項目については、使用する機器の取扱説明書を参照のこと。

- 品質管理
- インストールの手順
- 操作方法
- 測定の特徴
- 測定の手順
- バーコードオーバーライド
- ダイリューションプロトコル
- キャリブレーションの手順
- 操作上の留意事項および制限事項
- 保守と消耗品の交換

2. 測定法

検体の測定には以下の表のとおり、3つの方法がある。

測定方法	MODE	希釈倍率	検体量	使用するメトトレキサート濃度レベル
自動希釈法	42	全希釈倍率	80 μL	未知の場合
選択希釈法	42	1 : 1	80 μL	既知の場合
		1 : 10	50 μL	
		1 : 100	50 μL	
		1 : 1000	50 μL	
無希釈法	43	―	50 μL	＜ 1.0 μmol/L

本キットのキャリブレーションカーブの範囲は 0.00 ～ 1.00 μmol/L である。高濃度のメトトレキサートを含有したサンプルはキャリブレーションカーブ範囲内で機器により希釈されたサンプルで測定される。

(1) 本キットのキャリブレーションは使用する機器の取扱説明書にあるように、他のアッセイと同様に行われる。

注意：アッセイパラメータ 22.18 "MODE" は通常 Mode 42 の設定であるが、キャリブレーションは Mode 43 として行われる。キャリブレーションがキャリブレーション上のバーコードまたはバーコードオーバーライドで開始された場合、自動的に Mode 43 になり、キャリブレーションが完了した後、Mode 42 に戻るため、キャリブレーションする際に Mode 変更の必要はない。

(2) コントロール L、M、H は、Mode 43 における検体測定で使われる。コントロール M、X、Y、Z はダイリューションプロトコル（Mode 42）用である。

幅広い範囲において適切な感度を維持するために、検体測定には3つの方法があり、自動でメトトレキサート濃度 1000 μmol/L までの測定が可能である。

必要とする最小サンプル量：
50 μL　Mode 43（0 ～ 1.0 μmol/L）
　　　　Mode 42 ダイリューションプロトコル　1:10、1:100、1:1000
80 μL　Mode 42 ダイリューションプロトコル　1:1
　　　　Mode 42 ダイリューションプロトコル（メトトレキサート全希釈）

① 自動希釈法（MODE 42）

本プロトコルはメトトレキサート濃度レベルが未知の検体に用い、アッセイは Mode 42 で行われる。

(1) アッセイ用カローセルを選ぶ。
(2) アッセイ用カローセルに、1検体につき4個の TDX サンプルカートリッジとサンプルキュベットをセットする。
(3) カローセルをロックする。
(4) 1検体あたり4個ずつセットした TDX サンプルカートリッジのそれぞれ最初のポジション（1、5、9、13、17）に無希釈検体またはコントロールを 80 μL 以上分注する。
(5) コントロールは Z を用いる。
(6) 試薬パックを機器にセットする。
(7) カローセルをセットし、ドアを閉める。
(8) RUN キーを押す。
METHOTREXATE が表示された後、MTX DIL PROTOCOL が表示される。
(9) 無希釈検体またはコントロールの 10 倍、100 倍、1000 倍希釈は、次の3つのサンプルカートリッジのサンプルウェルの中で行われる。全ての希釈されたサンプルはキュベットへ分注される。試薬が加えられ、バックグランド蛍光強度と偏光量が確定し、キャリブレーションカーブの範囲に入った偏光量を示す各検体の最初の希釈が特定される。希釈倍率で補正された濃度が印刷される。μmol/L 単位で印刷された濃度は無希釈の検体またはコントロールの濃度である。一般的な検体結果の印刷例を以下に示す。

MTX DILUTION PROTOCOL

LOC	SAMPLES CONC	NET P	BLK I
1	0.41	131.61	1565.44
2		198.58	1345.23
3		206.33	1317.02
4		205.67	1364.18
****CONCENTRATION = 0.41****			
5	0.79	80.20	1606.90
6		190.21	1365.22
7		203.98	1320.76
8		205.17	1420.02
****CONCENTRATION = 0.79****			
9		31.76	1648.31
10	4.83	120.01	1391.27
11		194.24	1324.50
12		203.98	1303.91
****CONCENTRATION = 4.83****			

注意：本プロトコルで得られた結果は、μmol/L 単位でのみ印刷される。単位が変更されている場合は、濃度の代わりに "NO VALID ANSWER" が印刷される。

(10) 検体の濃度が測定範囲、またはキャリブレーションカーブ内に入る偏光量を示さない検体の場合は、濃度の代わりに "NO VALID ANSWER" が印刷される。これは以下の場合に起こる。

a) 1:1 希釈の濃度が 1.0μmol/L を超え、1:10 希釈の濃度が 0.9 μmol/L 未満のとき。
b) 1:10 希釈の濃度が 10.0 μmol/L を超え、1:100 希釈の濃度が 9.0 μmol/L 未満のとき。
c) 1:100 希釈の濃度が 100 μmol/L を超え、1:1000 希釈の濃度が 90.0 μmol/L 未満のとき。
d) 1:1000 希釈の濃度が 1000 μmol/L を超えたとき。

これらの場合、検体を TDX 希釈緩衝液を用いて用手法で希釈し、ダイリューションプロトコルにて再度測定しなければならない。

② 選択希釈法（MODE 42）

本プロトコルは自動希釈法の変法であり、メトトレキサート濃度レベルが判る時に用いる。各希釈倍率の適切な濃度レベルは以下の表を参照のこと。

検体濃度（μmol/L）	希釈倍率	検体量
0.0 - 1	1 : 1（無希釈）	80 μL
0.9 - 10	1 : 10	50 μL
9.0 - 100	1 : 100	50 μL
90.0 - 1000	1 : 1000	50 μL

本アッセイは、Mode 42 で行われる。バーコードオーバーライドで開始する。

(1) アッセイ用カローセルを選ぶ。
(2) アッセイ用カローセルに、1検体につき4個の TDX サンプルカートリッジとサンプルキュベットをセットする。
(3) カローセルをロックする。

(4) 1 検体あたり 4 個ずつセットした TDX サンプルカートリッジのそれぞれ最初のポジション（1、5、9、13、17）に無希釈検体またはコントロールを分注する。（検体量は表を参照する。）
(5) コントロールは、無希釈時は M、希釈倍率が 1:10 は X、1:100 は Y、1:1000 は Z を用いる。
(6) 試薬パックを機器にセットする。
(7) カローセルをセットし、ドアを閉める。
(8) バーコードオーバーライドで選択希釈法が開始される。

a) ASSAY 22 RUN キーを押すと、
TDXFLX アナライザー のみ #_____________ が表示される。
試薬パックの 13 桁のバーコードを入力またはスキャンし、STORE キーを押す。
その後 CALIBRATION ? が表示される。
TDX アナライザーではすぐに、CALIBRATION ? が表示される。
b) NEXT キーを押すと、CAROUSEL # ? が表示される。
c) カローセル番号を入力し、STORE キーを押す。
d) 希釈倍率が順に表示される。
NEXT キーを押すと、次に進む。
MTX DIL 1:1 ?
MTX DIL 1:10 ?
MTX DIL 1:100 ?
MTX DIL 1:1000 ?
e) 目的とする希釈倍率が表示されたら、STORE キーを押し、測定を開始する。希釈倍率は 1 回の測定につき、1 種類のみ選択できる。

(9) 全ての検体は希釈され、選択された希釈倍率の検体のみがキュベットに分注され、試薬が加えられ、バックグランド蛍光強度と偏光量が確定し、希釈倍率で補正された検体濃度がμmol/L 単位で印刷される。
自動希釈法と選択希釈法の結果は 4 つずつに分けられて印刷される。一番目の検体は 1 ～ 4 のポジションに表示される。二番目の検体は 5 ～ 8 のポジションに示される。三番目の検体は 9 ～ 12 のポジションに、四番目の検体は 13 ～ 16 のポジションに、五番目の検体は 17 ～ 20 のポジションに、各検体濃度結果に沿って示される。一般的な検体結果の印刷例を以下に示す。

MTX DILUTION PROTOCOL

LOC	SAMPLES CONC	NET P	BLK I
1			
2			
3	49.77	117.83	1310.59
4			
****CONCENTRATION = 49.77****			
5			
6			
7	48.26	120.02	1288.48
8			
****CONCENTRATION = 48.26****			

注意：本プロトコルで得られた結果は、μmol/L 単位でのみ印刷される。単位が変更されている場合は、濃度の代わりに “NO VALID ANSWER” が印刷される。

(10) MTX DIL 1:1000 ? が表示された後、NEXT キーを押すと、MTX ALL DILUTES ? が表示される。
STORE キーを押すと、自動希釈法が開始される。バーコードオーバーライドが必要な場合、自動希釈の間に実施する。
(11) 偏光量はキャリブレーションカーブの範囲内であるが、希釈検体濃度が適切な濃度レベルの規格を満足していない場合、濃度の代わりに “NO VALID ANSWER” が印刷される。この場合は、自動希釈法で再度測定しなければならない。

③ 無希釈法（MODE 43）

本プロトコルはメトトレキサート濃度が 1.0 μmol/L 未満であることがわかっている時のみ用いる。アッセイは Mode 43 で行われる。これらのサンプルはキャリブレーションカーブから直接読み取れるため、希釈する必要はない。

(1) アッセイ用カローセル、検体、コントロールを準備する。
(2) パラメータ 22.18、“Mode” を “43” に変更する。

a) ASSAY 22 • 18 EDIT 43 STORE キーを押す。
b) STOP キーを押す。

(3) 試薬パックを機器にセットする。
(4) カローセルをセットし、ドアを閉める。
(5) RUN キーを押し、測定を開始する。
(6) 測定が完了した後、各検体の偏光量と濃度が印刷される。
(7) 自動希釈または選択希釈を行う場合は、パラメータ 22.18、“Mode” を “42” に戻す。
(8) Mode 43 を用いて、同じカローセル内にて高値の検体と低値の検体を測定しないこと。キャリーオーバーは低い（< 0.05%）が、異常に高値の検体からのキャリーオーバーが起きた場合、測定値に影響を及ぼすことがある。Mode 43 にて高値の検体と低値の検体を一緒に測定した場合は、再度測定し確認すること。

3. キャリブレーション

キャリブレーションカーブが、次の規格に適合していることを確認する。

a) すべてのキャリブレータについて PERR（Polarization Error）が –4.00 ～ +4.00 の範囲に入っていること。
b) RMSE（Root Mean Squared Error）が 3.00 以下であること。
c) すべてのコントロールの測定値が管理範囲に入っていること。

次の場合には、再キャリブレーションを行う。
- メモリサーキットボード（Board #2）を交換したとき
- アッセイアクチベーションを実施したとき

次の場合には、必要に応じて再キャリブレーションを行う。
- コントロール値が本添付文書に記載された管理範囲を外れたとき
- PERR もしくは RMSE の値が上記の規格を外れたとき
- 新しいロット番号の試薬を使用するとき
- 新しいロット番号の希釈緩衝液を使用するとき
- 分注系の消耗品を交換したとき
- 機器のキャリブレーションを行ったとき

再キャリブレーションが必要かどうか判断する際には、すべてのコントロールを測定する。コントロール値が管理範囲に入っていれば、再キャリブレーションを行うことなく患者検体の測定ができる。コントロール値が管理範囲を外れている場合は、使用する機器の取扱説明書を参照のこと。

4. 品質管理

- 8 時間ごとに、1 種類のコントロールを 1 回測定すること。また、24 時間ごとに、臨床的な判断に用いる濃度を含んだ、少なくとも 2 種類の濃度のコントロールを各 1 回測定すること。コントロールは患者検体として測定し、サンプルカローセルのどの位置にも設置可能である。施設の精度管理手順が、より頻繁にコントロールを測定することを定めている場合、当該施設の手順に従うこと。
- コントロールの測定値が、本添付文書に記載されている管理範囲に入っていることを確認する。
- 各施設は独自の品質管理ルールを、品質管理データに適応することができる。一例として、Levey-Jennings plot を用いた測定結果の追跡調査などが挙げられる。詳細については、各施設の基準に従うこと。
- コントロールの測定値が管理範囲を外れている場合、正しい測定結果が得られていない可能性がある。測定結果を報告する前に、測定結果の評価を行い、是正措置をとること。各施設の品質管理の方針と合わせて、使用する機器の取扱説明書を参照のこと。

5. 結果

機器のソフトウェアにより、最適なキャリブレーションカーブが算出される。このキャリブレーションカーブはメモリに保存され、検体の蛍光偏光度に相当する薬物濃度の算出に使用される。
詳細については、使用する機器の取扱説明書を参照のこと。
単位をμg/mL からμmol/L に変換する場合は、変換係数 2.2005 を掛けること。

【測定結果の判定法】

約 0.02 μmol/L 以下のメトトレキサート血清レベルが DNA 合成の回復に必要であるとみなされていたが、メトトレキサート血清レベルと腫瘍性効力の間に正確な関係は確立されていない [2]。メトトレキサートの毒性を予測させるような腫瘍細胞に対しての血清メトトレキサート薬物濃度と存続時間の相関関係は示されている。4 ～ 6 時間続けて静脈にメトトレキサート 50 mg/m^2 ～ 15 g/m^2 を投与した後、患者の血清中濃度は、24 時間後で 5 ～ 10 μmol/L 以上、48 時間後で 0.5 ～ 1.0 μmol/L 以上、72 時間後で 0.2 μmol/L 以上となり、この場合、投与量の低いロイコボリン救援療法では毒性リスクが高くなる。よって、投与量の高いロイコボリン救援療法が望ましい [3–5]。典型的な毒性症状としては、骨髄抑制、口内炎、悪心、吐き気、てんかん、肝臓と腎臓の異常がある [6]。また、貧血、白血球減少、血小板減少、骨粗しょう症、皮膚と粘膜に関与する致命的な結果 [7–9] や、神経毒症、白質脳症も毒性の影響として報告されている [10–12]。

判定上の注意

- 自己免疫疾患患者の検体では免疫反応の場合、非特異的反応が起こりうるので測定結果に基づく診断は他の検査や臨床症状等を考慮して総合的に判断すること。
- すべての診断と同様に、本キットの測定値を用いての診断は、臨床症状および他の診断法で得られた情報と合わせて総合的に判断すること。
- マウスモノクローナル抗体を用いた製剤による診断または治療を受けた患者の検体中には HAMA（Human Anti-Mouse Antibodies：抗マウスヒト抗体）が含まれている可能性がある。HAMA を含む検体をマウスモノクロナール抗体を用いたキットで測定した場合、正しい測定値が得られない可能性がある [13,14] ので、このような検体は本キットでは測定しないこと。
- メトトレキサート大量投与の救援療法として Carboxypeptidase G2 が投与された患者の検体は、本キットで測定してはならない。これらの検体では、4-[[2,4-diamino-6-(pteridinyl) methyl]-methylamino]-benzoic acid（DAMPA）の濃度が増加し、本キットで使用しているメトトレキサート抗体と交差反応が生じる [15,16,17]。
- 本アッセイの濃度範囲は、0.00 ～ 1000 μmol/L であるが、まれに検体中のメトトレキサート濃度が 1000 μmol/L を超える値を示すことがある。このような検体の場合は、TDX 希釈緩衝液を用いて用手法で希釈し、ダイリューションプロトコルにて再度測定しなければならない。
- 検体のバックグランド蛍光強度がパラメータ “MX BKG” の値より大きいと、“BLK I” の値の後に “HI” がプリントアウトされる。詳細は使用する機器の取扱説明書を参照のこと。

【性　能】

(1) 感度

感度を、95%の信頼度でゼロと区別できる最小検出濃度としたところ、0.02 μmol/L であった。

(2) 再現性

再現性は、濃度が 0.07、0.40、0.80、5、50、500 μmol/L になるようにメトトレキサートを添加したヒト血清を用いて、National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) プロトコル EP5-T2[18] に従って検討した。結果は以下の表に示したとおりで、コントロール M、H、X、Y、Z に相当する濃度では CV (%) は 10%未満で、コントロール L に相当する濃度では CV (%) は 15%未満であった。主な結果を次に示す。

n = 80

ターゲット値		0.07	0.40	0.80	5	50	500
平均値 (μmol/L)		0.07	0.40	0.83	5.04	49.81	495.16
測定内再現性	SD	0.005	0.006	0.012	0.17	1.12	12.97
	CV (%)	7.9	1.5	1.5	3.4	2.3	2.6
日差再現性	SD	0.007	0.018	0.042	0.22	1.57	19.04
	CV (%)	10.3	4.5	5.1	4.4	3.2	3.8
総再現性	SD	0.009	0.022	0.049	0.28	2.92	27.02
	CV (%)	14.0	5.4	5.9	5.6	5.9	5.5

(3) 回収率による正確性

回収率は、血清と緩衝液に、0.15、0.30、0.60 μmol/L のメトトレキサートを添加し検討した。 血清キャリブレータでキャリブレーションし、血清と緩衝液をそれぞれ 5 重測定し、求めた回収率は以下のとおりであった。

添加濃度 (μmol/L)	測定値 (μmol/L)		回収率 (%)
	血清に添加	緩衝液に添加	
0.15	0.14	0.14	100.00
0.30	0.29	0.28	103.57
0.60	0.55	0.57	96.49

$$\text{回収率（\%）} = \frac{\text{血清添加時の測定値}}{\text{緩衝液添加時の測定値}} \times 100$$

(4) 測定範囲

本キットによる血中メトトレキサート量の測定範囲は、0.02 ～ 1000 μmol/L である。

(5) 相関性試験成績及び較正用の基準物質

1. 相関性試験成績

メトトレキサートの治療を受けている患者検体を用いて本キットと TDX- メトトレキサート「アボット」および HPLC の相関性について検討した。メトトレキサート濃度が 0.02 ～ 1000 μmol/L の範囲において、本キットは無希釈法 (MODE 43) と自動希釈法 (MODE 42) で、TDX- メトトレキサート「アボット」はモード 11 と 3 を用いて検討した。データは以下のとおりである。

本キット VS	検体数	切片	傾き	相関係数
TDX- メトトレキサート「アボット」(0.02 ～ 1.0 μmol/L)	49	− 0.02	0.93	0.989
TDX- メトトレキサート「アボット」(0.02 ～ 1000 μmol/L)	99	− 0.24	0.95	1.00
HPLC (0.03 ～ 1000 μmol/L)	95	− 0.02	1.01	0.999

2. 較正用の基準物質

社内標準品は USP Grade のメトトレキサート標準品に準拠し、キャリブレータは重量法を用いて社内標準品に対して調整している。

＊＊＊【使用上又は取扱い上の注意】

(1) 取扱い上（危険防止）の注意

＊＊＊ ・**注意：**本キットの測定では、ヒト検体を取り扱う。検体は、HIV、HBV、HCV 等の感染の恐れがあるものとして取り扱うこと。本測定で使用する試薬類には、ヒト由来および / または潜在的に感染性のある物質が含まれている。詳細は、**【形状・構造等（キットの構成）】**または**【用法・用量（操作方法）】**を参照のこと。ヒト由来物質または不活化微生物が完全に感染伝播しないことを保証する試験は知られていない。すべてのヒト由来物質は潜在的に感染性があると考えて、OSHA Standard on Bloodborne Pathogens[19] に従って取り扱うこと。感染性物質を含む、またはその疑いがある物質については、バイオセイフティレベル 2[20]、または他の適切なバイオセイフティ基準 [21,22] を使用すること。検査にあたっては、感染の危険を避けるため、専用の着衣、眼鏡、マスクおよび使い捨て手袋を着用し、また口によるピペッティングは行わないこと 。

＊＊ ・キャリブレータ、コントロールに含まれるヒト血清は、HBs 抗原陰性、HIV-1 RNA 陰性または HIV-1 抗原陰性、HCV 抗体陰性、HIV-1/HIV-2 抗体陰性である。

・試薬が誤って目や口に入った場合には水で十分に洗い流す等の応急措置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けること。

＊＊ ・本測定で使用する試薬類には、保存剤としてアジ化ナトリウムが含まれているものがある。詳細は、**【形状・構造等（キットの構成）】**または**【用法・用量（操作方法）】**を参照のこと。酸との接触により非常に毒性の強いガスが発生する。内容物および容器は適切な方法で廃棄すること。

(2) 使用上の注意

・使用期限を過ぎた試薬類を使用しないこと。
・キット内または異なるキットの試薬を混ぜて使用しないこと。
・同一のロット番号の試薬であっても試薬を注ぎ足すことはしないこと。
・キャリブレータ、コントロールは、使用前に穏やかに 5 回以上転倒混和すること。
・試薬、キャリブレータ、コントロールは、2 ～ 8℃で保存すること。
・試薬、キャリブレータ、コントロールは、指示に従い保存し取り扱った場合、使用期限まで安定である。
・使用する機器の取扱説明書を参照のこと。

(3) 廃棄上の注意

・検体中には HIV、HBV、HCV 等の感染性のものが存在する恐れがあるので、廃液、使用済み器具などは次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素濃度 1,000 ppm、1 時間以上浸漬）またはグルタルアルデヒド（2%、1 時間以上浸漬）による消毒処理、あるいはオートクレーブ（121℃ 、20 分以上）による滅菌処理を行うこと。
・試薬および器具等を廃棄する場合には、廃棄物の処理および清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規定に従って処理すること。
・試薬類や検体が飛散した場合には、飛散した溶液を吸収剤で吸収し、飛散した場所を洗浄液で拭き取った後、さらに 0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液などの適切な消毒剤で拭き取ること。作業は適切な保護用具（手袋、安全眼鏡、実験衣など）を着用して行うこと。
・本測定で使用する試薬類には、保存剤としてアジ化ナトリウムが含まれているものがある。詳細は、**【形状・構造等（キットの構成）】**または**【用法・用量（操作方法）】**を参照のこと。アジ化ナトリウムは、鉛管、銅管と反応して爆発性の金属アジドを生成することがあるので、廃棄する場合には、大量の水と共に流すこと。安全な廃棄方法の詳細については、使用する機器の取扱説明書を参照のこと。

【貯蔵方法、有効期間】

貯蔵方法：2 ～ 8℃に保存する。
有効期間：試薬パック 20 箇月
　　　　　使用期限は、外装に表示されている。

【包装単位】

メトトレキサート-Ⅱ・ダイナパック

○ 試薬パック　　製品番号 7A12-86：100 回用
・試薬Ⓦ　4 mL　1 ビン
・試薬Ⓟ　3.5 mL　1 ビン
・試薬Ⓢ　4.0 mL　1 ビン
・試薬Ⓣ　3.5 mL　1 ビン

＊【主要文献】

1. Tietz NW, Finley PR, Pruden EL, eds. Clinical guide to laboratory tests. 2nd Edition. Philadelphia, PA : W.B. Saunders Company,1990 ; 724.
2. Young RC, Chabner BA. An in vivo method for monitoring differential effects of chemotherapy on target tissues in animals and man : Correlation with plasma pharmacokinetics. *J Clin Invest* 1973 ; 52(6) abstract 340 : 92a.
3. Crom WR, Evans WE. Methotrexate. In : Evans WE, Schentag JJ, Jusko WJ, eds. *Applied Pharmacokinetics : Principles of Therapeutic Drug Monitoring*. Vancouver, WA : Applied Therapeutics, Inc., 1992 ; 29-1 to 29-42.
4. Nirenberg A, Mosende C, Mehta BM, Gisolfi AL, Rosen G. High-dose methotrexate with citrovorum factor rescue : Predictive value of serum methotrexate concentrations and corrective measures to avert toxicity. *Cancer Treat Rep* 1977 ; 61(5) : 779-83.
5. Djerassi I, *et al.* New "Rescue" with massive doses of citrovorum factor for potentially lethal methotrexate toxicity. *Cancer Treat Rep* 1977 ; 61(4) : 749-50.
6. Jaffe N, Traggis D. Toxicity of high-dose methotrexate (NSC-740) and citrovorum factor (NSC-3590) in osteogenic sarcoma. *Cancer Chemother Rep* 1975 ; 6(1) : 31-6.
7. Chan H, Evans WE, Pratt CB. Recovery from toxicity associated with high-dose methotrexate : Prognostic factors. *Cancer Treat Rep* 1977 ; 61(5) : 797-804.
8. Von Hoff DD, *et al*. Incidence of drug-related deaths secondary to high-dose methotrexate and citrovorum factor administration. *Cancer Treat Rep* 1977 ; 61(4) : 745-8.
9. Mazanec DJ, Grisanti JM. Drug-induced osteoporosis. *Cleve Clin J of Med* 1989 ; 56 : 297-303.
10. Chessells JM, *et al*. Neurotoxicity in lymphoblastic leukaemia : Comparison of oral and intramuscular methotrexate and two doses of radiation. *Archives of Disease in Childhood* 1990 ; 65 : 416-22.
11. Allen JC, Rosen G, Mehta BM, Horten B. Leukoencephalopathy following high-dose Iv methotrexate chemotherapy with leucovorin rescue. *Cancer Treat Rep* 1980 ; 64(12) : 1261-73.
12. Jacobs P, Rutherford GS, King HS, Vincent M. Methotrexate encephalopathy. *Eur J Cancer* 1991 ; 27(8) : 1061-2.
13. Primus FJ, Kelley EA, Hansen HJ, Goldenberg DM. "Sandwich"-type immunoassay of carcinoembryonic antigen in patients receiving murine monoclonal antibodies for diagnosis and therapy. *Clin Chem* 1988 ; 34(2) : 261-4.
14. Schroff RW, Foon KA, Beatty SM, Oldham RK, Morgan Jr AC. Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Research* 1985 ; 45 : 879-85.
15. Chabner BA, Johns DG, Bertino JR. Enzymatic cleavage of methotrexate provides a method for prevention of drug toxicity. *Nature* 1972 ; 239(5372) : 395-7.
16. Widemann BC, *et al*. Carboxypeptidase-G2 rescue in a patient with high dose methotrexate-induced nephrotoxicity. *Cancer* 1995 ; 76(3) : 521-6.
17. Buchen S, *et al*. Carboxypeptidase G2 rescue in patients with methotrexate intoxication and renal failure. *British Journal of Cancer* 2005 ; 92(3) : 1-8.
18. Kennedy JW, *et al*. Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices. *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)* 1992 ; 12(4).
19. ＊ US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Bloodborne pathogens.
20. ＊ US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 5th ed. Washington, DC : US Government Printing Office ; January 2007.
21. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. 3rd ed. Geneva : World Health Organization ; 2004.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections : Approved Guideline - Third Edition*. CLSI Document M29-A3.Wayne, PA : Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.

参考文献

・Borsi JD, Sagen E, Romslo I, Moe PJ. Comparative study on the pharmacokinetics of 7-hydroxymethotrexate after administration of methotrexate in the dose range of 0.5 - 33.6 g/m^2 to children with acute lymphoblastic leukemia. *Medical and Pediatric Oncology* 1990 ; 18 : 217-24.
・Borsi JD, Sagen E, Romslo I, Slordal L, Moe PJ. 7-Hydroxymethotrexate concentrations in serum and cerebrospinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* 1990 ; 27 : 164-7.
・*Physicians' Desk Reference*.47th Edition. Montvale, NJ : Medical Economics Co. Inc., 1993.
・Wolfrom C, Hepp R, Hartmann R, Breithaupt H, Henze G. Pharmacokinetic study of methotrexate, folinic acid, and their serum metabolites in children treated with high-dose methotrexate and leucovorin rescue. *Eur J Clin Pharmacol* 1990 ; 39 : 377-83.

【問い合わせ先】

アボット ジャパン株式会社
カストマーサポートセンター
〒270-2214　千葉県松戸市松飛台278
TEL 0120－031441

【製造販売業者の名称及び住所】

アボット ジャパン株式会社
〒270-2214　千葉県松戸市松飛台278
TEL 047（385）2211（代表）